

REGULATORY ROLE OF THE NERVOUS SYSTEM ON THE PIGMENTATION OF GOLDFISH: AN EXPERIMENT IN GENETIC ENGINEERING

ABSTRACT

The action that the nervous system exerts on the set of cells of chromatophores fish, many established researchers rely on experiences of excitement and nerves sectioning, and electrical stimulation trials and mutilation of certain centers and nerve tracts. Yet, and despite the harmony that exists in the study of chromatic physiology of teleost, regarding the monitoring by the nervous system to the pigment cells, diametrically opposed results, targeted on the subject by several researchers, underline the desirability of conducting further studies. This article is the description of a work which is part of the experiments performed in our laboratory, in order to determine the role of different factors in the pigmentation system of the goldfish -*Carassius auratus*.

Keywords: *Carassius auratus*, nervous system, pigmentation, teleosts.

FUNCIÓN REGULADORA DEL SISTEMA NERVIOSO EN LA PIGMENTACIÓN DE LA CARPA DORADA: UN EXPERIMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA

Javier Cifuentes Portocarrero, Adriana Loaiza Poteros

Grupo de investigación en ciencias biológicas GEN

grupogen@myway.com

(Artículo de INVESTIGACIÓN) (Recibido el 14 de abril de 2009. Aceptado el 18 de julio de 2009)

RESUMEN

La acción que el sistema nervioso ejerce sobre el conjunto de células cromatóforas de los peces, la establecieron numerosos investigadores apoyándose en experiencias de excitación y de seccionamiento de nervios, así como en ensayos de estimulación eléctrica y de mutilación de determinados centros y tractos nerviosos. Con todo, y no obstante la armonía que existe en el estudio de la fisiología cromática de los teleósteos, en lo que atañe al control que ejerce el sistema nervioso a las células pigmentarias, los resultados diametralmente opuestos, apuntados sobre la materia por diversos investigadores, ponen de manifiesto la conveniencia de realizar otros estudios al respecto. En este artículo se hace la descripción de un trabajo que forma parte de las experiencias que se realizan en nuestro laboratorio, con el objeto de determinar el papel que desempeñan diferentes factores en el sistema de pigmentación de la carpa dorada - *Carassius auratus*.

Palabras clave: *Carassius auratus*, sistema nervioso, pigmentación, teleósteos.

INTRODUCCIÓN

Por muchos años se consideró que el sistema nervioso era el factor único en el control del estado pigmentario de los vertebrados, hipótesis que fue particularmente fundamentada en las observaciones de Elias (1942) en anfibios y en las de Franz (1939) y Franz y Gray (1941) en peces. Los últimos experimentaron con platijas del género *gobius niger*, al destruir las fibras simpáticas o al seccionar los nervios espinales en un punto inferior a la entrada de las ramas comunicantes, obtuvieron invariablemente las siguientes respuestas: 1) oscurecimiento producido por la dispersión pigmentaria de

los melanocitos en la zona afectada, y 2) incapacidad de las células pigmentarias denervadas para responder a estímulos ambientales. Estos resultados fueron corroborados, entre otros, por Fries (1942-1) en *salmo fario* y en *anguilla fluviatilis*, al obtener en estos animales una concentración de los gránulos pigmentarios, utilizando la técnica del seccionamiento nervioso combinada con el método de la excitación por medio de corrientes inductoras. De la misma manera, los estudios de Fries (1931), Parker (1935), Abramowitz (1935, 1936), Odiorne (1937), Wykes (1938), Brown y Cunningham (1941) y otros, comprobaron

claramente la participación de los teleósteos, al obtener invariablemente respuestas de los cromatóforos en el seccionamiento nervioso, así como en la estimulación de fibras, de tractos y de centros. Por su parte Atwell (1937) demostró histológicamente la innervación de los cromatocitos en peces del género *phoxinus*.

Diversas zonas del cerebro, y en particular de la médula oblonga, se propusieron como albergue del centro cromafórico, y como resultado del estudio del sistema cromatósico del *proxinus*, Etkin (1941) concluye la existencia de dos centros cromatofóricos concentrantes: uno colocado en el extremo cefálico de la médula oblonga y el segundo, que según este investigador actúa independientemente del cerebro, situado en la médula espinal a partir de la quinceava vértebra. Los resultados de los experimentos de Etkin sugieren además la existencia de un tercer centro cromatofórico de tipo dispersante en la región del mesencéfalo. La existencia en el cerebro de un centro para el control de los cambios pigmentarios fue planteada además por Mast (1915) y por Hower (1931); mientras que Fukui (1923) la localiza en la médula espinal.

La acción del sistema nervioso sobre los cromatocitos se ha interpretado de diversas maneras: Jores (1937) comparó al nervio melanofórico y a sus efectores, las células cromáticas, con preparaciones neuromusculares de tipo estriado, considerando la contracción como el estado activo de los cromatocitos provocado por la actividad del nervio cromático, y a la dispersión como una fase de reposo determinada por la actividad del mismo nervio, equivalente a la relajación que experimenta un músculo al ser seccionado su nervio motor.

La interpretación de Jores fue modificada parcialmente por Franz y Gray (1941), al descubrir que los cromatóforos de los peces estaban controlados por fibras nerviosas autónomas, y no como supuso Jores por fibras cerebro-espinales, por lo que consideró como más apropiado comparar las fibras motoras pigmentarias y sus efectores con preparaciones neuromusculares de tipo involuntario; Spaeth (1916) también consideró a los melanóforos como un tipo diferenciado de célula muscular.

Por otro lado, el fisiólogo Breider (1939) consideró a los cromatocitos como células sensitivas dotadas de fibras nerviosas concentrantes y de fibras nerviosas dispersantes. La existencia de fibras concentrantes en los teleósteos ha sido establecida de manera convincente; mientras que la evidencia relacionada con las fibras de tipo dispersante es escasa y dudosa. Spaeth y Barbour (1917), Ginsberg (1929) y Smith (1931), trataron de demostrarlas experimentando con diferentes drogas; a la vez que Mills (1932 1,2), Abramowitz (1935, 1936), Parker (1934), Fries (1942-2, 1943) y otros, intentaron comprobar su existencia utilizando el método de las bandas caudales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los resultados de este trabajo se basan en el estudio de doce carpas *Carassius auratus* Linneo, adultos, hembras y machos, de 12 a 15 centímetros de longitud, de color café oliváceo, procedentes del lago de Xochimilco. Los animales se dividieron por partes iguales en dos grupos, uno testigo y el otro de experimentación. La denervación caudal se realizó de acuerdo con la técnica de Parker (1934), que consiste en colocar al animal, previamente anestesiado con hielo, sobre una placa de cristal y seccionando transversalmente bajo el microscopio de disección uno o dos rayos cercanos a los bordes superior e inferior de la aleta caudal, con sus correspondientes nervios y el tejido interradsial. Para evitar el derrame sanguíneo se hizo la incisión cerca del límite de las escamas del pedúnculo caudal, evitando cortar los vasos radiales. Se hicieron recuentos celulares de los melanocitos epidérmicos, anotándose su aspecto de acuerdo con la tabla de Slome y Hogben (1929).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general los efectos producidos por el seccionamiento nervioso en el *Carassius auratus* concuerdan con los observados por diferentes autores en otras especies de teleósteos. Los cortes denervantes realizados en la aleta caudal de peces adaptados a fondos blanco y negro, produjeron invariablemente la dispersión pigmentaria de los melanocitos denervados. En los animales conservados en acuarios de fondo blanco, las bandas caudales aparecieron a los 3 minutos después de la operación, y se mantuvieron visibles durante varios días. El mismo

fenómeno se observó en los peces adaptados al fondo negro, siendo en estos animales menos perceptibles por razón del tinte oscuro de su revestimiento.

Los melanocitos situados en los contornos de las bandas caudales de animales, colocados primero en acuarios de fondo negro y posteriormente en recipientes pintados de blanco, reaccionaron diversamente a la excitación eléctrica. Algunas de las células pigmentarias periféricas respondieron repetidamente a la excitación eléctrica, exclusivamente con movimientos de dispersión; en otras, la reacción al mismo estímulo consistió únicamente en movimientos concentrantes; en un tercer grupo, el estímulo eléctrico produjo tanto concentración como dispersión pigmentaria. Aún cuando la evidencia proporcionada por estos experimentos no permite deducir una conclusión definitiva, con respecto a las diferentes respuestas presentadas por los cromatóforos periféricos a los estímulos eléctricos, opinamos que los resultados anotados constituyen un indicio de que las células pigmentarias del *Carassius auratus* son de tipo sensitivo, siendo muy probable que con el seccionamiento nervioso se les prive de uno y de otro tipo de fibras. Sin embargo, para aclarar este problema, por demás complejo, es indispensable un mayor número de investigaciones utilizando diferentes métodos de ataque.

La reactivación de las bandas caudales observadas por Parker (1934), en peces del género *fundulus*, fue también examinada en la carpa con resultados confirmatorios. Las bandas caudales, producidas por seccionamiento de fibras nerviosas, empiezan a desaparecer gradualmente a partir del quinto día después de la operación. Una segunda incisión dentro de la zona denervada y en proceso de concentración pigmentaria, origina invariablemente el obscurecimiento de la zona caudal a la incisión, lo que demuestra que los cortes denervantes no ocasionan la parálisis de los cromatóforos sino que éstos son capaces de responder a nuevas estimulaciones.

Igualmente se hizo la observación de que una banda pálida limitada por dos bandas nuevas, volvía a oscurecerse en dirección centripeta - de la superficie al centro- no advirtiéndose este fenómeno en zonas normales

restringidas entre dos bandas caudales. Lo anterior, según la interpretación de Parker en otras especies de peces, obedece a que los impulsos concentrantes y dispersantes son transmitidos a los cromatóforos a través de los neurohumores secretados por las terminaciones nerviosas, en los que la acetilcolina es el neurohumor dispersante y la adrenalina o alguna sustancia semejante como el factor concentrante. La adrenalina, hormona que actúa directamente sobre los cromatóforos produciendo movimientos de concentración pigmentaria en los mismos, interrumpe la acción dispersante del sistema nervioso. Cuando se utilizan simultáneamente los métodos del seccionamiento nervioso y la inyección de diferentes concentraciones de adrenalina por vía intramuscular, no se presentan las bandas caudales hasta que pasa el efecto de la adrenalina, lo que sucede generalmente en un tiempo que varía entre dos y tres horas, según la dosis inyectada.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudiaron doce carpas *Carassius auratus* Linneo adultos, hembras y machos, de 12 a 15 centímetros de longitud, y adaptados a fondos blanco y negro antes de la denervación; se examinó la acción que el sistema nervioso ejerce sobre las células pigmentarias de este animal, utilizando el método de las bandas caudales, la estimulación eléctrica y la aplicación intramuscular de diferentes dosis de adrenalina. De los resultados obtenidos se puede concluir:

1. Que el seccionamiento nervioso en la aleta caudal del *Carassius auratus* induce una dispersión pigmentaria.
2. Que tal dispersión es más notable en peces adaptados a fondo blanco que en aquellos que se mantienen en recipientes pintados de negro.
3. Los cromatóforos situados en la periferia de las bandas caudales, responden en forma diversa a los estímulos eléctricos, fenómeno que puede considerarse como evidencia de una doble inervación cromatofórica.
4. Los cortes denervantes no ocasionan la parálisis de los cromatóforos ya que las bandas caudales pueden ser reactivadas por una segunda incisión posterior a la primera.

5. La adrenalina interrumpe la acción dispersante del sistema nervioso.
6. Las bandas caudales que empiezan a palidecer, limitadas por dos bandas nuevas, reoscurecen en dirección centripeta, proceso que no se advierte en zonas normales restringidas entre dos bandas caudales.

GLOSARIO

Cromatóforo: son células con pigmentos en su interior que reflejan la luz. Pueden encontrarse en diversos seres vivos como los anfibios, los peces, ciertos crustáceos y algunos cefalópodos. Son los principales responsables de la coloración de la piel, del color de los ojos en los animales ectotermos y de la formación de la cresta neural a lo largo del desarrollo embrionario.

Melanocito: es una célula del sistema inmune que deriva de la cresta neural y que migra hacia la epidermis y el folículo piloso durante la embriogénesis -embrión + génesis. Su

principal función es la producción de melanina, un pigmento de la piel, ojos y pelo.

Phoxinus: peces -carpas- de agua dulce incluidos en el orden *Cypriniformes*, distribución cosmopolita por ríos de Asia, Europa y América del Norte. Tienen el cuerpo alargado de pequeño tamaño, algunas especies tienen cierto valor comercial por su pesca o por su mantenimiento en acuario.

Platija: son peces planos que tienen los dos ojos a un lado del cuerpo, que queda expuesto mientras el pez yace de costado sobre los fondos marinos. Su cuerpo es plano, con escamas en algunas especies y sin ellas en otras y sólo está coloreado en el costado expuesto.

Teleósteos: Clase de peces en la que está comprendida la mayoría de las especies conocidas, caracterizada por tener un esqueleto completo.

REFERENCIAS

1. Abramowitz, A. A. (1935). Regeneration of Chromatophores Nerves. Proceedings of the national Academy of Sciences, Vol. 21, No. 2, pp. 137-141.
2. Abramowitz, A. A. (1936). The Non-identity of the Neurohumours for the Melanophores and Xanthophores of *Fundulus*. American Naturalist, Vol. 70, pp. 372-378.
3. Atwell, W. J. (1937). Functional trasplants of the primordium of the epithelial hypophysis in Amphibia. Anatomic Record, Vol. 68, pp. 431-447.
4. Breider, H. (1939). Über die Vorgänge der Kern Vermehrung und-degeneration in sarkomatösen Makromelanophoren. Z. wiss Zool, Vol. 152, pp. 89-116.
5. Brown, F. A. and Cunningham O. (1941). Upon the presence and distribution of a chromatophorotropic principle in the central nervous system of *Limulus*. Biological Bull Wood hole, No. 81, pp. 80-95.
6. Elias, H. (1942). Chromatophores as evidence of phylogenetic evolution. American Nature, Vol. 76, pp. 405-414.
7. Etkin, W. (1941). On the control of growth and activity of the pars intermedia of the pituitary by the hypothalamus in the tadpole. Journal of Experimental Zoology, Vol. 86, pp. 113-139.
8. Franz, S. and Gray S. (1941). The response of melanophores in normal and hypophysectomized frogs to varying concentrations of pituitrin. Anatomic Record, No. 81, pp. 92-103.
9. Franz, V. (1939). Struktur und mechanismus der melanophoren. Zoölogy Zellforsch, Vol. 30, pp. 194-234.
10. Fries, E F. B. (1931). Color changes in fundulus, with special consideration of the xanthophores, in killifish (*Fundulus*). Journal of Experimental Zoology, Vol. 51, pp. 389-426.
11. Fries, E. F. B. (1942-1). Some neurohumoral evidence for double innervation of xanthophores in killifish. Biol Bull Woods Hole, Vol. 82, pp. 261-272.

12. Fries, E. F. B. (1942-2). Pituitary and Nervous Control of Chromatic Responses, Especially of Xanthophores in Killifish (*Fundulus*). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Vol. 51, pp. 170-171.
13. Fries, E. F. B. (1943). Some Neurohumoral Evidence for Double Innervation in Killifish (*Fundulus*). *Biological Bulletin*, No. 82, pp. 261-272.
14. Fukui, T. (1923). Notes on Experiments on the Color Change of the File-fish. *Folia Anatomica Japonica*, Vol. 1, pp. 345-348.
15. Ginsberg, J. (1929). Beiträge zur Kenntnis der Guaninophoren und Melanophoren. *Zoologische Jahrbücher*, Vol. 51, pp. 227-260.
16. Hewer, H. R. (1931). Studies in Colour-Changes of Fish. *British Journal of Experimental Biology*, Vol. 37, pp. 493-513.
17. Jores, A. (1937). Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen der Nebennieren auf die Hypophyse. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 102, pp. 289-291.
18. Mast, S. O. (1915). Changes in Shade, Color and Pattern in Fishes and their Bearing on Certain Problems of Behavior and Adaptation. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, Vol. 1, No. 4, pp. 214-219.
19. Mills, S. M. (1932, 1). The Double Innervation of Fish Melanophores. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 64, pp. 231-244.
20. Mills, S. M. (1932, 2). Evidence for a Neurohumoral Control of Fish Melanophores. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 64, pp. 245-255.
21. Odiorne, J. M. (1937). Morphological Color Changes in Fishes. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 76, pp. 441-465.
22. Parker, G. H. (1934). Cellular Transfer of Substances especially Neurohumors. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 11, pp. 81-88.
23. Parker, G. H. (1935). The Disappearance of Primary Caudal Bands in the Tail of *Fundulus* and its Relation to the Neurohumoral Hypothesis. *Proceedings of the American Philosophical Society*, Vol. 75, pp. 1-10.
24. Slome, D. and Hogben L. T. (1929). The Chromatic Function in *Xenopus laevis*. *South African Journal of Science*, Vol. 25, pp. 239-245.
25. Smith, D. C. (1931). The Influence of Humoral Factors upon the Melanophores of Fishes, Especially *Phoxinus*. *Journal of Comparative Physiology*, Vol. 15, No. 4, pp. 613-636.
26. Spaeth, R. A., and Barbour H. G. (1917). The action of epinephrine and ergo-toxin upon single, physiologically isolated cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 9, pp. 431-440.
27. Speath, R. A. (1916). Evidence proving the melanophore to be a disguised type of smooth muscle cell. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 20, pp. 193-215.
28. Wykes, U. (1938). The control of photo-pigmentary responses in Eyeless Catfish. *Journal of Experimental Biology*, Vol. 15, pp. 363-370.

Ω